

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
30. Januar 2003 (30.01.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/007980 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: A61K 38/08,
A61P 43/00, 39/00, 9/00, 11/00, 17/02, 1/16

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE02/02583

(22) Internationales Anmeldedatum:
13. Juli 2002 (13.07.2002)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
101 34 243.8 14. Juli 2001 (14.07.2001) DE

CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,
MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU,
SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT,
SE, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

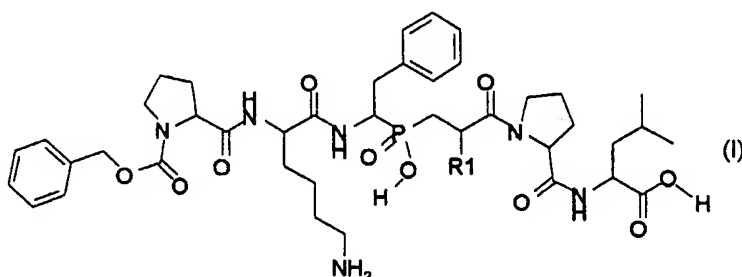
Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(71) Anmelder und
(72) Erfinder: BURCHARDT, Elmar, Reinhold [DE/DE];
Damaschkeweg 69, 42113 Wuppertal (DE). STÖCKER,
Walter [DE/DE]; Sepp-Herberger-Str. 26, 48301 Nottulm
(DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,

(54) Title: PHOSPHINATE-PEPTIDE ANALOGUES AS INHIBITORS OF PROCOLLAGEN-C-PROTEINASE (PCP) FOR
TREATING FIBROTIC DISEASES

(54) Bezeichnung: PHOSPHINAT-PEPTIDANALOGA ALS INHIBITOREN DER PROCOLLAGEN-C-PROTEINASE (PCP)
ZUR BEHANDLUNG VON FIBROTISCHEN ERKRANKUNGEN



(57) Abstract: The invention relates to the use of phosphinate-peptide analogues of general formula (I) as inhibitors of procollagen-C-proteinase (PCP), for treating fibrotic diseases.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft die Verwendung von Phosphinat-Peptidanaloga der allgemeinen Formel (I) als Inhibitoren der Procollagen-C-Proteinase (PCP) zur Behandlung fibrotischer Erkrankungen.

WO 03/007980 A1

**Phosphinat-Peptidanaloga als Inhibitoren der Procollagen-C-Proteinase (PCP)
zur Behandlung von fibrotischen Erkrankungen**

In der Beschreibung ist eine Reihe von Dokumenten genannt. Der Offenbarungsgehalt dieser Dokumente, einschließlich Gebrauchsanweisungen vom Hersteller, ist hiermit per Referenz inkorporiert.

Die Erfindung betrifft die Verwendung von Phosphinat-Peptidanaloga als Inhibitoren der Procollagen-C-Proteinase (PCP) zur Behandlung fibrotischer Erkrankungen. Die Erfindung auf dem Gebiet der Biotechnologie ist dadurch gekennzeichnet, dass geeignete Phosphinat-Peptidanaloga ebenso wie deren Salze entwickelt wurden, die spezifisch die Procollagen-C-Proteinase (PCP), ein Schlüsselenzym der Fibrogenese, inhibieren.

Es ist bekannt, dass die PCP ein Schlüsselenzym der Fibrogenese ist. Sie katalysiert die hydrolytische Abspaltung der Procollagenpropeptide von den Procollagenen I, II, III und IV sowie Laminin V¹. Somit ist die PCP ein Schlüsselenzym der Collagenprozessierung². In BMP-I-knock-out-Mäusen wurde nachgewiesen, dass eine komplette Abwesenheit der PCP zu einer unvollständigen Collagenprozessierung mit der Ablagerung von atypischen, lockeren Collagenfibrillen führt³.

Die PCP ist wahrscheinlich auch für die hydrolytische Abspaltung der Propeptidsequenz der Lysyloxidase verantwortlich. Wahrscheinlich führt die Abspaltung der Prosequenz zur Aktivierung der katalytischen Lysyloxidaseaktivität der maturen Form⁴. Aktive Lysyloxidase verknüpft gegenüberliegende Collagenfibrillen kovalent miteinander. Auf diese Weise wird die biologische Stabilität des Collagens gegenüber dem Abbau durch Collagenasen indirekt auch durch die PCP erhöht.

Die PCP oder eng verwandte Proteine scheinen auch bei der Freisetzung von TGF β -artigen Wachstumsfaktoren eine Rolle zu spielen. Durch neue Arbeiten konnte gezeigt werden, dass PCP-ähnliche Proteasen TGF β -artige Wachstumsfaktoren aus einem inaktiven Komplex mit TGF β -Bindungsproteinen herauslösen können⁵⁶. Dabei wird der Bindungspartner der TGF β -artigen Wachstumsfaktoren durch spezifische Proteolyse zersetzt. Indirekt besitzt die PCP also möglicherweise auch eine TGF β -agonistische Aktivität. Daher kann der PCP eine entscheidende Rolle in der Fibrogenese zugesprochen werden.

Die PCP-Aktivität geht auf Splicevarianten des BMP-I-Gens zurück⁷⁸⁹. Bislang wurden verschiedene Splicevarianten dieses Proteins identifiziert, deren biologische Funktion zum Teil unklar ist. Bislang ist gesichert, dass die Splicevarianten BMP I-I und BMP I-III (tld-Variante) Procollagen und Pro-Lysyloxidase spezifisch schneiden können. Durch neuere Arbeiten wurden weitere BMP-1-Splicevarianten identifiziert, deren biologische Funktion und Substratspezifität aber noch ungeklärt ist.¹⁰

Obwohl die Expressionsklonierung und Aufreinigung der PCP bisher nur in kleinen Ausbeuten gelungen ist, sind von dem Enzym zahlreiche strukturelle Details bekannt. Die PCP gehört nämlich zur Familie der Astacinproteasen, und die Kristallstruktur dieses Proteins ist im Detail bekannt. Zwischen der katalytischen Domäne von BMP-I und Astacin gibt es einen sehr hohen Grad an struktureller Homologie, so dass es möglich war, vielen Aminosäuren der PCP-Proteasedomäne aufgrund dieser Homologie die wahrscheinliche strukturelle und biochemische Funktion zuzuordnen.¹¹

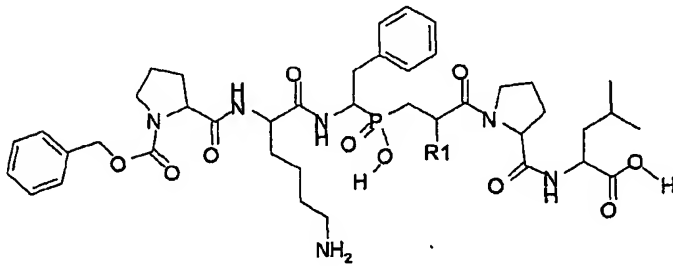
Durch computergesteuertes "Molecular Modelling" konnte in der Vergangenheit die Substratbindung an das aktive Zentrum des BMP-I im molekularen Detail hergeleitet werden¹². Diese Arbeiten führten zum "rational design" von Phosphinat-Peptidanaloga, die das Astacin mit hoher Wirkpotenz inhibieren. Der Komplex zwischen einem Phosphinatinhibitor und Astacin wurde strukturell aufgeklärt¹³.

Bisher wurde trotz der hohen strukturellen Homologie zwischen Astacin und der katalytischen Domäne von BMP-1 davon ausgegangen, dass die beiden Proteasen sich aufgrund biochemischer Unterschiede hinsichtlich ihres Reaktionsverhaltens auch in der Hemmbarkeit durch Proteaseinhibitoren deutlich unterscheiden. Biochemische Unterschiede zwischen

Astacin und BMP-I bestehen z.B. hinsichtlich der Substratspezifität (Astacin hydrolysiert als Verdauungsenzym des Flußkrebses relativ unspezifisch kollagenartige Proteine, während die PCP hochspezifisch an nur einer Stelle im Procollagenmolekül und in der Pro-Lysyloxidase schneidet).

In der Literatur sind bisher nur niederpotente Inhibitoren der PCP beschrieben, denen eine antifibrotische Wirkung zugeschrieben wird¹⁴.

Überraschenderweise wurde jetzt gefunden, dass Phosphinatpeptidanaloga der allgemeinen Formel (I)



in welcher

R1 für Wasserstoff oder Methyl steht,

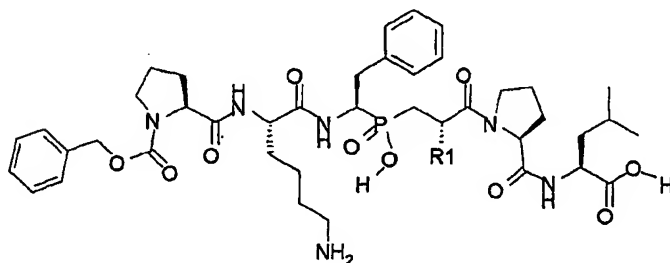
und deren Salze und Isomere die PCP mit sehr hoher Wirkpotenz inhibieren und deshalb zur
15 Behandlung und Prophylaxe von fibrotischen Erkrankungen verwendet werden können.

Im Rahmen der Erfindung sind physiologisch unbedenkliche Salze bevorzugt. Physiologisch unbedenkliche Salze sind im allgemeinen Salze der erfindungsgemäßen Verbindungen mit anorganischen oder organischen Säuren. Bevorzugt werden Salze mit anorganischen Säuren, wie Salzsäure, Bromwasserstoffsäure, Phosphorsäure oder Schwefelsäure oder Salze mit organischen Carbon- oder Sulfonsäuren, wie Essigsäure, Maleinsäure, Fumarsäure, Apfelsäure, Zitronensäure, Weinsäure, Michsäure, Benzoesäure, oder Methansulfonsäure, Ethansulfonsäure, Phenylsulfonsäure, Toluolsulfonsäure oder Naphtalindisulfonsäure.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen können in stereoisomeren Formen existieren, die sich entweder wie Bild und Spiegelbild (Enantiomere), oder die sich nicht wie Bild und Spiegelbild (Diastereomere) verhalten. Die Erfindung betrifft sowohl die Antipoden als auch die Racematformen sowie die Diastereomeregemische.

Die Verbindungen der allgemeinen Formel (I) können in allen enantiomeren und diastereomeren Formen vorliegen. Bevorzugt sind diejenigen Isomeren, in denen die aus Prolin, Lysin und Leucin gebildeten Molekülteile die L-Konfiguration besitzen, ebenso wie deren Salze und Prodrugs.

Besonders bevorzugt werden diejenigen Phosphinatpeptidanaloga der allg. Formel (Ia), die wie folgt konfiguriert sind

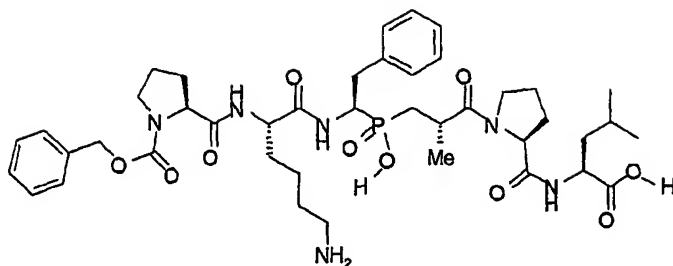


in welcher

R1 für Wasserstoff oder Methyl steht

und deren Salz und Isomere zur Behandlung und Prophylaxe von fibrotischen Erkrankungen verwendet.

Ganz besonders bevorzugt wird die Verbindung der Formel (Ib)



im folgenden als **Z—PKF(PC)APC—O—H** bezeichnet,

deren Enantiomere und deren Salze zur Behandlung und Prophylaxe von fibrotischen Erkrankungen verwendet.

Die Verbindungen der allgemeinen Formel (I) sind bekannt und können nach üblichen
 5 Methoden der Peptidsynthese aus entsprechenden Phinioylverbindungen hergestellt werden^{15 16}.

Zur vorliegenden Erfindung gehören auch pharmazeutische Zubereitungen, die neben inerten, nicht-toxischen, pharmazeutisch geeigneten Hilfs- und Trägerstoffen eine oder mehrere Verbindungen der allgemeinen Formel (I) enthalten, oder die aus einem oder mehreren Wirkstoffen der Formeln (I) bestehen, sowie Verfahren zur Herstellung dieser Zubereitungen.

Die Wirkstoffe der Formeln (I) sollen in diesen Zubereitungen in einer Konzentration von 0,1 bis 99,5 Gew.-%, bevorzugt von 0,1 bis 95 Gew.-%, der Gesamtmischung vorhanden sein.

Neben den Wirkstoffen der Formel (I) können die pharmazeutischen Zubereitungen auch andere pharmazeutische Wirkstoffe enthalten.

Die oben aufgeführten pharmazeutischen Zubereitungen können in üblicher Weise nach bekannten Methoden hergestellt werden, beispielsweise mit dem oder den Hilfs- oder Trägerstoffen.

Im allgemeinen hat es sich als vorteilhaft erwiesen, den oder die Wirkstoffe der Formel (I) in Gesamtmengen von etwa 0,01 bis etwa 100 mg/kg, bevorzugt in Gesamtmengen von etwa 1

mg/kg bis 50 mg/kg Körpergewicht je 24 Stunden, gegebenenfalls in Form mehrerer Einzelgaben, zur Erzielung des gewünschten Ergebnisses zu verabreichen.

Es kann aber gegebenenfalls vorteilhaft sein, von den genannten Mengen abzuweichen, und zwar in Abhängigkeit von der Art und vom Körpergewicht des behandelten Individuums, vom individuellen Verhalten gegenüber dem Medikament, der Art und der Schwere der Erkrankung, der Art der Zubereitung und Applikation, sowie dem Zeitpunkt bzw. Intervall, zu welchem die Verabreichung erfolgt.

20

Diese Ergebnisse waren unerwartet, weil sich BMP-I, Meprin und Astacin vor allem im sogenannten SI'-Loop unterscheiden. Ein Ausschnitt aus diesem Loop ist hier dargestellt:

Astacin:	T--DPYD
BMP-I:	KPPIG-Q
Meprin:	I -- IG-Q

2.5 Dieser Loop bildet den essentiellen Teil der SI'-Bindungstasche der Astacin-ähnlichen Proteasen. Hier liegt, wie am Beispiel des Astacins und des Meprins gezeigt wurde, der Schlüssel zur unterschiedlichen Substrat- und Inhibitorspezifität beider Enzyme. In der SI'-Tasche unterscheiden sich Meprin und Astacin sehr deutlich. Die PCP hat zusätzlich zwei Prolinreste und einen Lysinrest in dieser Region. Wie durch Computermodelling der Proteasedomäne der PCP gezeigt werden konnte, ist der Lysinrest sehr wahrscheinlich an der Bindung der Carboxylgruppe in der Seitenkette des Aspartats in P1' neben der Spaltstelle im Procollagen beteiligt. Die Prolinreste liegen nach dem Modell in der cis-Konfiguration vor und sind eine Eigentümlichkeit der BMP-I-Subfamilie unter den Astacinen. Im Gegensatz dazu spaltet Astacin nicht neben sauren Resten. Aus diesen Gründen war es völlig unerwartet, dass sich ein für die Inhibition von Astacin entworfenes Phosphinat¹⁷ als effektiver PCP-Hemmstoff erwies.

5

Die erfindungsgemäßen Verbindungen der allgemeinen Formel (I) zeigen ein nicht vorhersehbares, wertvolles pharmakologisches Wirkspektrum.

Überraschenderweise zeichnen sich die erfindungsgemäßen Verbindungen durch eine sehr hohe Wirkpotenz bei der Inhibition der PCP aus.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen sind deshalb zur Behandlung von Leberfibrosen jeder Genese und von Fibrosen mit anderer Organmanifestation geeignet.

- Dazu gehört eine diverse Gruppe von Krankheiten, die mit einer qualitativ veränderten Collagenproduktion oder mit einer verstärkten Ablagerung von Collagen im Extrazellularraum einhergehen. Zu dieser Gruppe von Erkrankungen gehören u.a. Leberfibrosen unterschiedlichen Ursprungs, wie z.B. alkoholische Leberzirrhose, biliäre Zirrhose, Hepatitiden
- 10 viraler oder anderer Genese, idiopathische interstitielle Fibrosen, idiopathische Lungenfibrosen, akute pulmonale Fibrosen, das "acute respiratory distress syndrome" (ARDS), perimuskuläre Fibrosen, perizentrale Fibrosen, Dermatofibrome, Nierenfibrosen, die diabetische Nephropathie, Glomerulonephritiden, die systemische oder lokale Sklerodermie, Keloide, die hypertrophe Narbenbildung, Gelenkadhäsionen, Arthrosen, Myelofibrosen, Vernarbungen der
- 15 Cornea, die cystische Fibrose, muskuläre Fibrosen, die Duchenne'sche Muskeldystrophie, Ösophagusstrikturen, Morbus Ormond, Morbus Crohn, Colitis ulcerosa und Aneurysmen der großen Gefäße.

- Außerdem umfasst die Erfindung fibrotische Erkrankungen, die initiiert oder hervorgerufen werden durch chirurgische Narbenrevisionen, plastische Chirurgie, Glaukome,
- 20 Kataraktfibrosen, Vernarbungen der Cornea, die sogenannte "graft versus host disease", chirurgische Eingriffe an Sehnen, Nerveneinklemmungssyndrome, die Dupuytren'sche Kontraktur, Adhäsionen infolge gynäkologischer Eingriffe, pelvische Adhäsionen, peridurale Fibrosen, Erkrankungen der Schilddrüse oder der Nebenschilddrüsen, durch metastatischen Knochenbefall, durch das multiple Myelom oder durch Restenosen.

Nachweis der PCP-Aktivität im Fluoreszenzdequenchtest

Zum Nachweis der PCP-Aktivität wurde ein synthetisches Dekapeptidsubstrat mit der Sequenz

DABCYL - Asp - Phe - Tyr - Arg - Ala - Asp - Gen - Pro - Arg - Asp (EDANS) - NH₂

durch Zusatz von PCP gespalten. Diese Peptidfrequenz entspricht der Region im Procollagen $\alpha_2(I)$, die von PCP gespalten wird. Die Spaltsequenz ist biochemischen Experten bekannt¹⁸, ebenso das Verfahren des Dequenchtests¹⁹.

Die Konzentration des synthetischen Peptids war 5,6 μM , die finalen Pufferbedingungen waren: 50 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl und 0,005% Brij35.

Die Durchführung des kinetischen Test erfolgte wie im folgenden beschrieben: Das Fluoreszenzsubstrat wurde in 90 μl Reaktionspuffer gelöst. Die Kinetik des Substratumsatzes durch MMP-2 wurde in Doppelbestimmungen durch Fluoreszenzmessung (Ex. 365 nm/Em. 450 nm) zwischen 0 bis 120 min detektiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe einer geeigneten Aktivität von PCP, in 10 μl Reaktionspuffer gelöst, gestartet. In Zeitintervallen von anfangs 5min und später in größeren Zeitintervallen wurde die Emission als ein Maß der proteolytischen Aktivität gemessen. Als Negativkontrolle wurde der spontane Zerfall des Fluoreszenzsubstrats bei Zugabe von Reaktionspuffer ohne PCP-Aktivität gemessen. Die Fluoreszenzmessungen erfolgten über einen Zeitraum von ca. 4h bei 37°C. Nach Ablauf der Reaktion wurde das Substrat durch Zugabe von Proteinase K (Boehringer Mannheim, 1,44 μg /Reaktionsansatz, gelöst in 10 μl PBS) und Inkubation bei 37°C für 20 min vollständig zersetzt. Die Vollständigkeit der Hydrolyse wurde dadurch gezeigt, dass keine Zunahme der Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Zeit mehr erfolgte.

Der relative Substratumsatz in % der Gesamtmenge errechnete sich aus:

$$\% \text{ Umsatz} = (F_t - F_{-t}) / (F_{\text{total}} - F_{\text{ini}}) \times 100\%$$

wobei F_t die relative Fluoreszenz nach einem Zeitintervall t unter Inkubation mit PCP ist. F_{-t} ist die korrespondierende relative Fluoreszenz nach dem Zeitintervall t ohne PCP-Zusatz, F_{total} ist die Fluoreszenz nach Totalhydrolyse durch Zusatz von Proteinase K, und F_{ini} ist die initiale relative Fluoreszenz vor Start der Reaktion durch Zugabe von Proteinase K.

In dem Test wurde die verwendete PCP-Aktivität typischerweise so eingestellt, dass mit uninhibiertem Enzym innerhalb des Messzeitraumes ca. 20% des Substrats umgesetzt wurden.

- 5 In Abbildung 1 ist eine typische Reaktionskinetik (% Umsatz) unter Zugabe des Phosphatininhibitors Z---PKF(PC)APC---O-X dargestellt.

Die prozentuale Inhibition unter Zugabe der Inhibitoren errechnete sich nach:

$$\% \text{ Inhibition} = 100\% \times \% \text{ Umsatz (mit Inhibitor)} \div \% \text{ Umsatz (ohne Inhibitor)}$$

- 10 In Abbildung 2 wird die Konzentrations-Wirkungsbeziehung eines Phosphatininhibitors dargestellt.

Rekombinante Herstellung der katalytischen Domäne von BMP-I

- Im Fluoreszenzaktivitätstest wurde die katalytische Domäne von BMP-I eingesetzt. Die entsprechende cDNA-Sequenz ist aus der Literatur bekannt²⁰ und wurde durch RT-PCR erhalten. Die entsprechenden Primers enthielten upstream eine *Ecl*XI und downstream eine *Sal*I-Schnittstelle, so dass das Insert gemäß den Angaben des Herstellers Biometra²¹ in den *E. coli*-Expressionsvektor pASK75 inseriert werden konnte. Dies geschah durch einen Verdau
- 15 des Plasmids pASK75 mit den Restriktionsenzymen *Bsa*I und *Sal*I. Diese Schnittstellen sind Bestandteile der "multiple cloning site" von pASK75. Die Details dieser Klonierungsschritte sind molekularbiologischen Experten aus der Literatur bekannt²².

- Die Besonderheit dieses Clonierungsansatzes liegt darin, dass die Proteasedomäne ohne
- 20 zwischengeschaltete Aminosäuren auf die Prosequenz des "outer membrane protein A" (ompA) folgt. Da die Prosequenz von ompA bei der Sekretion ins Periplasma proteolytisch abgespalten wird, wird bei erfolgreicher periplasmatischer Sekretion der N-Terminus der katalytischen Domäne von BMP-I freigelegt. Es ist bekannt, dass der N-Terminus bei Proteasen aus der Astacinfamilie eine besondere Rolle bei deren Aktivierung spielt. Er faltet sich nämlich ins aktive Zentrum des Enzyms zurück und bildet so über Wasserstoffbrückenbindungen die stabile aktive Konformation des Enzyms aus.

Die Expression der Proteasedomäne von BMP-I wird durch zwei Faktoren erschwert:

- 5 1. Das Protein neigt zur Bildung von schwer löslichen *inclusion bodies*. Dies zeigt sich z.B. dadurch, dass in den meisten *E. coli*-Stämmen bei der Expression dieses Proteins keine löslichen Formen gefunden wurden. Außerdem ist die Verweildauer des rekombinanten Proteins im Cytoplasma wahrscheinlich sehr kurz, so dass bei seiner Expression regelmäßig das N-terminale Methionin nicht abgespalten wird. Somit ist es häufig schwierig, den freien N-
10 Terminus zu rekonstituieren, der für die Herstellung der enzymatische Aktivität der Proteasedomäne notwendig ist.

2. Das aktive Protein ist für *E. coli* toxisch, so dass die Expression von ATG-Vektoren in den meisten Stämmen zu schlechten oder überhaupt keinen Ausbeuten an rekombinantem Protein führt.

- 15 Bisher sind nur wenige Literaturstellen bekannt, in denen über die erfolgreiche rekombinante Expression des Proteins berichtet wird. Die beschriebenen Ausbeuten sind jeweils sehr gering. In Verbindung mit der niedrigen Wechselzahl der PCP (6 h^{-1})²³ wird klar, weshalb bisher erst wenige potente Inhibitoren der PCP beschrieben wurden.

- Für die Testung und Findung von PCP-Inhibitoren ist die Herstellung größerer Aktivitäten an
20 PCP unerlässlich. Dieses Problem wurde mit dem oben beschriebenen Konstrukt gelöst. Durch die periplasmatische Sekretion des Proteins wird die cytoplasmatische Toxizität gemindert, zumal die PCP erst beim Übertritt ins Periplasma durch die ompA-spaltende Protease aktiviert wird. Die exzessive inclusion body-Bildung kann durch Absenkung der Reaktionstemperatur gemäß den Empfehlungen aus dem Protokoll des Herstellers und durch die Auswahl eines
25 geeigneten Expressionsstamms erreicht werden.

Spezifitätsnachweis der PCP-Inhibitoren durch Untersuchung an der Matrix-Metalloprotease
Typ 2 (MMP2) *in vitro*

MMP-2 (72 kD Type IV Collagenase, Gelatinase A) gehört zur Familie der Matrixmetalloproteasen, die in der Lage sind, Bestandteile der extrazellulären Matrix (Elastin, Fibronectin, Kollagene Typ IV, VII und X in helikalen Domänen und Gelatine) abzubauen²⁴.

Das Enzym wird als inaktive Vorstufe (72 kD) von zahlreichen Zellen mesenchymalen Ursprungs sezerniert. Zur Bildung der aktiven 62 kD-Form wird *in vivo* ein aminoterminals Propeptid abgespalten. Im nachfolgend beschriebenen Enzymassay (*in vitro*) wurde durch p-Aminophenyl-Quecksilberacetat (APMA) die latente in die aktive Form überführt.

Aktivierung: 1 U MMP-2 (Boehringer Mannheim, isoliert aus humanen Fibrosarcoma-Zellen, 200 U/mg) wurde in 50 mM Tris/Cl pH 7,5, 0,05 % (v/v) Triton X 100, 1 mM CaCl₂ mit 2,5 mM APMA 30 Minuten bei 37°C aktiviert²⁵.

Enzymassay: In einem Volumen von 195 µL wurden 0,5 U aktivierte MMP-2 mit 1 µM Z---PKF(PC)APC---O-X 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 5 µl Substrat (final 50µM) ((Dnp-Pro-β-cyclohexyl-Ala-Gly-Cys(Me)-His-Ala-Lys(N-Me-Abz)-NH₂), Bachem AG, wurde die enzymatische Reaktion gestartet²⁶. Die Emission wurde als ein Maß der
15 protolytischen Enzymaktivität von MMP-2 durch Fluoreszenzmessung (Excitationswellenlänge 365 nm und initiale Emission bei 538 nm) in Zeitintervallen zwischen 0 bis 120 min detektiert. Die Spaltsequenz ist biochemischen Experten bekannt²⁷, ebenso das Verfahren des Dequenchtests²⁸.

Folgende Reaktionsansätze wurden durchgeführt: Als Negativkontrolle diente der spontane
20 Zerfall des Substrates ohne MMP-2. Nicht aktivierte MMP-2, bzw. durch APMA aktivierte MMP-2, diente als Referenz zur aktivierten MMP-2 inkubiert mit 1 µM Z---PKF(PC)APC---O-H (Abbildung 2).

Abbildung 2 zeigt klar die Spezifität des hochwirksamen Phosphinat-Peptidanalogen Z---PKF(PC)APC---O-H zu PCB. Die verwendete aktivierte Matrix-Metalloprotease Typ 2
25 wurde auch bei Konzentrationen bis zu 1 µM (dosisabhängig) nur unwesentlich bei der Umsetzung des fluoreszenzmarkierten Peptids inhibiert.

Demonstration der biologischen Wirksamkeit

Die biologische Wirksamkeit der Substanzen kann in Zellkulturassays und *in vivo* demonstriert werden. Nach Applikation der Inhibitoren kann in humanen Zelllinien z.B. der Abfall der

Konzentration an freiem Procollagen alpha 1 Typ III Propeptid in den Überständen gemessen werden, weil dieses Peptid durch die Aktivität der PCP freigesetzt wird. Zur Messung der PIIICP-Konzentrationen im Überstand kann ein kürzlich etablierter Assay verwendet werden²⁹.

Zum Nachweis des antifibrotischen Effekts der Substanzen in der Leber können z.B. das Tiermodell der akuten³⁰ oder chronischen³¹ Tetrachlorkohlenstoff-induzierten Leberschädigung, das Modell der Leberfibrose durch Gallengangsligatur³² oder die durch
10 heterologes Serum induzierte Leberfibrose³³ verwendet werden. Auch andere Tiermodelle, bei denen eine Leberfibrose auftritt, können zum Nachweis des antifibrotischen Effekts verwendet werden.

Je nach Organmanifestation oder Art der fibrotischen Schädigung können auch Tiermodelle für andere Fibrosemanifestationen, z.B. im Herzen, in den Nieren, in den Lungen, in der Haut oder
15 anderen Organen verwendet werden.

Die Reduktion der Collagenablagerung kann z.B. durch die Bestimmung des Hydroxyprolingehalts³⁴ der fibrotischen Organe oder durch quantitative Morphometrie erfolgen³⁵.

Beschreibung der Abbildungen

Abbildung 1 zeigt den Substratumsatz des DABCYL-EDANS-Dekapeptides durch rekombinante PCP in Abhängigkeit von der Zeit. Die Enzymaktivität wird in Anwesenheit von 100 nM Inhibitor fast vollständig inhibiert.

Abbildung 2 zeigt die Konzentrations-Wirkungsbeziehung des Phosphinatinhibitors Z---PKF(PC)APC---O-H auf PCP

Abbildung 3 zeigt den Substratumsatz eines MMP-2 proteasespezifischen fluoreszenzmarkierten Peptides durch Metalloproteinase Typ 2 in Abhängigkeit von der Zeit. Die MMP-2 Enzymaktivität wird in Anwesenheit von 1 µM Z---PKF(PC)APC---O-H nicht inhibiert.

- a) Substrat: spontaner Zerfall von 50 μM Substrat in Testpuffer
- b) APMA: APMA und 50 μM Substrat
- c) MMP-2 inaktiv: MMP-2, nicht APMA-aktiviert, und 50 μM Substrat
- d) MMP/APMA: MMP-2, APMA-aktiviert, und 50 μM Substrat
- e) 1 μM Z---PKF(PC)APC---O-H:
MMP-2, APMA-aktiviert, und 50 μM Substrat
+ 1 μM Z---PKF(PC)APC---O-H

Literatur

-
- ¹ Amano S, Takahara K, Gerecke D, Nishiyama T, Lee S, Greenspan DS, Burgeson RE (1996) Bone morphogenetic protein-1 is the processing enzyme for laminin 5 in human keratinocytes. *Mol. Biol. Cell* 7 (suppl.) 58A
- ² Olsen BJ (1996) Morphogenesis: collagen it takes and bone it makes. *Curr. Biol.* 6: 645-647
- ³ Suzuki N, Labosky PA, Furata Y, Hargett I, Dunn R, Fogo AB, Takahara K, Peters DM, Greenspan DS, Hogan BL (1996) Failure of ventral body wall closure in mouse embryos lacking a procollagen C-proteinase encoded by BMP-1, a mammalian gene related to *Drosophila* tolloid. *Development* 122: 3587-3595
- ⁴ Pachenko MV, Stetler-Stevenson WG, Trubetskov OV, Gacheru SN, Kagan HM (1996) Metalloproteinase activity secreted by fibrogenic cells in the processing of prolysin oxidase. Potential role of procollagen C-proteinase. *J. Biol. Chem.* 271: 7113-7119
- ⁵ Marques G, Musacchio M, Shimell MJ, Wünnenberg-Stapleton K, Cho K W Y, O'Connor MB (1997) Production of a DPP activity gradient in the early *drosophila* embryo through the opposing actions of the SOG and TLD proteins. *Cell* 91: 417-426
- ⁶ Blader P, Rastegar S, Fischer N, Strähle U (1997) Cleavage of the BMP antagonist chordin by zebrafish tolloid. *Science* 278: 1937-1940
- ⁷ Kessler E, Takahara K, Biniaminow L, Brusel M, Greenspan DS (1996) Bone morphogenetic protein-1: The type I procollagen C-proteinase
- ⁸ Reddi AH (1996) BMP-1: Resurrection as procollagen C-proteinase. *Science* 271: 463
- ⁹ Li SW, Sieron AL, Fertala A, Hojima Y, Arnold WV, Prockop DJ (1996) The C-proteinase that processes procollagens to fibrillar collagens is identical to the protein previously identified as bone-morphogenetic protein-1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 5127-5130
- ¹⁰ Janitz M, Heiser V, Böttcher U, Landt O, Lauster R (1998) Three alternatively spliced variants of the gene coding for the human bone morphogenetic protein-1. *J. Mol. Med.* 76: 141-146
- ¹¹ Stöcker W, Gomis-Rüth FX, Bode W, Zwilling R (1993) Implications of the three-dimensional structure of astacin for the structure and function of the astacin family of zinc-endopeptidases. *Eur. J. Biochem.* 214: 215-231
- ¹² Stöcker W, Grams F, Baumann U, Reinemer P, Gomis-Rüth FX, McKay DB, Bode W (1995) The metzincins – Topological and sequential relations between the astacins,

adamalysins, serralsins, and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-endopeptidases. *Prot. Sci.*: 823-840

¹³ Grams F, Dive V, Yiotakis A, Yiallourous I, Vassilou S, Zwilling R, Bode W, Stöcker W (1996) Structure of astacin with transition-state analogue inhibitor. *Nature Struct. Biol.* 3: 671-675

¹⁴ Brenner M, Ho WB (1996) C-proteinase inhibitors for the treatment of disorders related to the overproduction of collagen. patent application WO 97/05865

¹⁵ Yiotakis A, Vassilio S, Jiracek J, Dive V (1996) Protection of the Hydroxyphosphinyl Function of Phosphinic Dipeptides by Adamantyl. Application to the Solid-Phase Synthesis of Phosphinic Peptides. *J. Org. Chem.* 61: 6601-6605

¹⁶ Campagne JM, Coste J, Guillou L, Heitz A, Jouin P (1993) Solid phase synthesis of phosphinic peptides. *Tetrahedron Lett.* 34: 4181-4184

¹⁷ Yiallourous I, Vassiliou S, Yiotakis A, Zwilling R, Stöcker W, Dive V (1998) Phosphinic peptides, the first potent inhibitors of astacin, behave as extremely slow-binding inhibitors. *Biochem. J.* 331: 375-379

¹⁸ Lee ST, Kessler E, Greenspan DS (1990) Analysis of site-directed mutations in human pro- $\alpha 2(I)$ collagen which block cleavage by the C-proteinase. *J. Biol. Chem.* 265: 21992-21996

¹⁹ Matayoshi ED, Wang GT, Krafft GA, Erickson J (1989) Novel fluorogenic substrates for assaying retroviral proteases by resonance energy transfer. *Science* 247: 954-958

²⁰ Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW, Hewick RM, Wang EA (1988) Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 242: 1528-1534

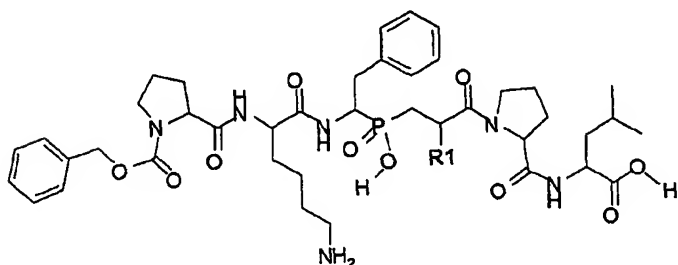
²¹ Instruction manual strep tag II system, Biometra 1994

²² Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press

²³ Prockop DJ, Sieron AL, Li SW (1998) Procollagen N-proteinase and procollagen C-proteinase. Two unusual metalloproteinases that are essential for procollagen processing probably have important roles in development and cell signaling. *Matrix Biol.* 16: 399-408

²⁴ Aimes RT & Quigley JP (1995) Matrix Metalloproteinase-2 is an interstitial Collagenase-Inhibitor-free enzyme catalyzes the cleavage of collagen fibrils and soluble native type-I collagen generating the specific $\frac{3}{4}$ -length and $\frac{1}{4}$ -length fragments, *J. Biol. Chem.*, 270: 5872-5876

-
- ²⁵ Gregory A. Grant, Arthur Z. Eiseb, Barry L. Marmer, William T. Roswit, and Gregory I. Goldberg (1987) The Activation of Human Fibroblast Procollagenase. *J. Biol. Chem.* 262: 5886-5889
- ²⁶ Bickett DM, Green MD, Berman J, Dezube M, Howe AS, Brown PJ, Roth JT, McGeehan GM (1993) A high throughput fluorogenic substrate for interstitial collagenase (MMP-1) and gelatinase (MMP-9). *Anal Biochem.* 212: 58-64
- ²⁷ Lee ST; Kessler E, Greenspan DS (1990) Analysis of site-directed mutations in human pro- $\alpha 2(I)$ collagen which block cleavage by the C-proteinase. *J. Biol. Chem.* 265: 21992-21996
- ²⁸ Matayoshi ED, Wang GT, Krafft GA, Erickson J (1989) Novel fluorogenic substrates for assaying retroviral proteases by resonance energy transfer. *Science* 247: 954-958
- ²⁹ Burchardt ER, Schröder W, Heke M, Kohlmeier J, Neumann R, Kroll W (1997) Expression cloning of C-terminal procollagen (III) propeptide and its use in a novel serum assay to monitor liver fibrogenesis. *Hepatology* 26: 487A
- ³⁰ Johnson S J, Hines JE, Burt AD. Phenotypic modulation of perisinusoidal cells following acute liver injury: a quantitative analysis. *Int. J. Exp. Path.* 1992; 73: 765-772
- ³¹ McLean E, McLean A, Sutton P. Instant Cirrhosis. An improved method for producing cirrhosis of the liver in rats by simultaneous administration of carbon tetrachloride and phenobarbitone. *Br. J. Exp. Pathol.* 1969; 50: 502-506
- ³² Kountouras J, Billing B, Scheuer P. Prolonged bile obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat. *Br. J. Exp. Pathol.* 1984; 65: 305-311
- ³³ Bhunchet E, Wake K. Suppression of experimental hepatic fibrosis by administration of vitamin A. *Lab. Invest.* 1985; 52: 182-194
- ³⁴ Gerling B, Becker M, Waldschmidt J, Rehmann M, Schuppan D. Elevated serum aminoterminal procollagen type-III-peptide parallels collagen accumulation in rats with secondary biliary fibrosis. *Hepatology* 1996; 25: 79-84
- ³⁵ Kauschke SG, Knorr A, Olzen M, Burchardt ER (1997) Expression of collagen (III) as determined by quantitative PCR and its correlation with extracellular collagen deposition in the rat CCl₄ model of liver fibrosis. *Hepatology* 26: 538A

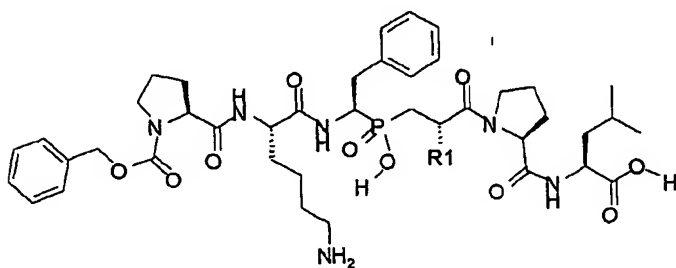
Patentansprüche**1. Verwendung von Phosphinat-Peptidanaloga der allgemeinen Formel (I)**

in welcher

R1 für Wasserstoff oder Methyl steht,

und/ oder deren Stereoisomere und Salze zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung
15 von fibrotischen Erkrankungen.

2. Verwendung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass Verbindungen der
allgemeinen Formel (I) mit der in der Formel (Ia) aufgezeigten Konfiguration

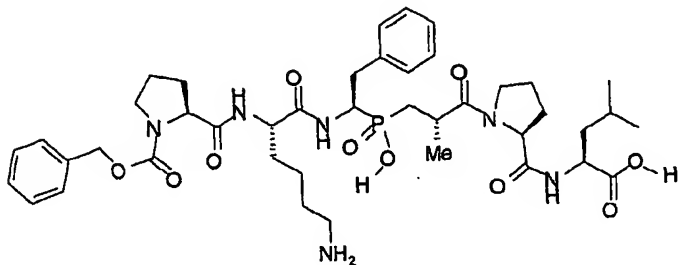


in welcher

R1 für Wasserstoff oder Methyl steht,

und/ oder deren Stereoisomere und Salze verwendet werden.

3. Verwendung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Verbindung der Formel (Ib)



und/ oder deren Enantiomere und Salze verwendet wird.

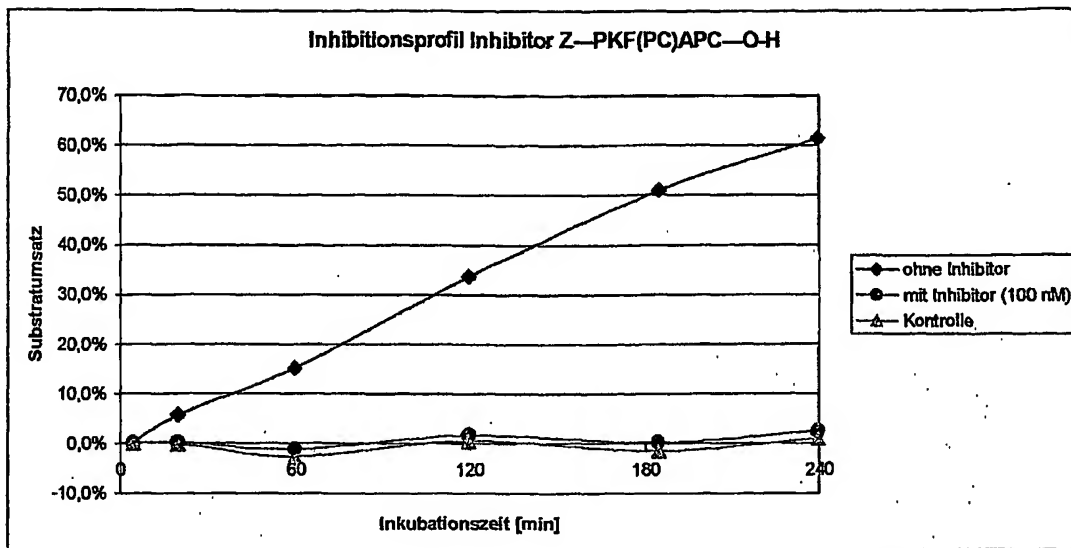


Abbildung 1

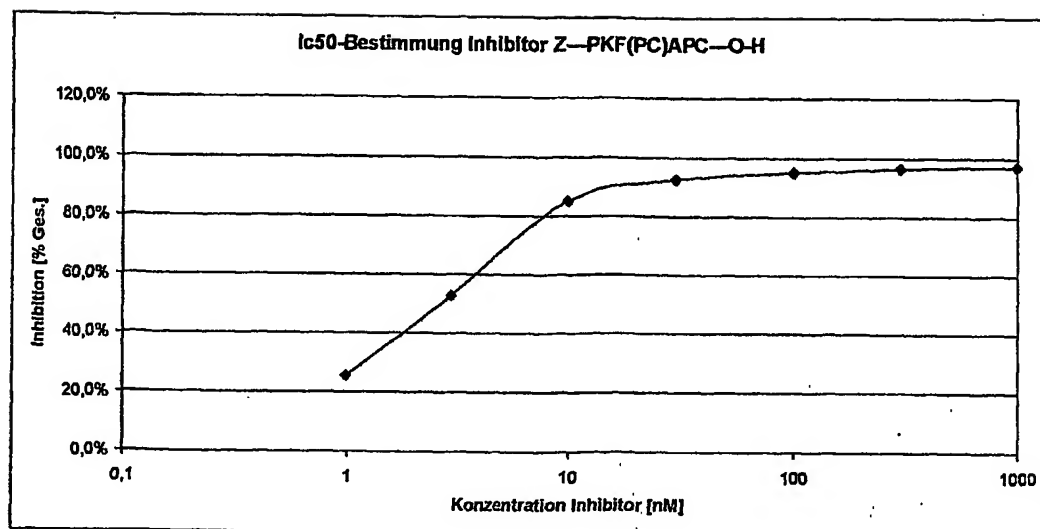


Abbildung 2

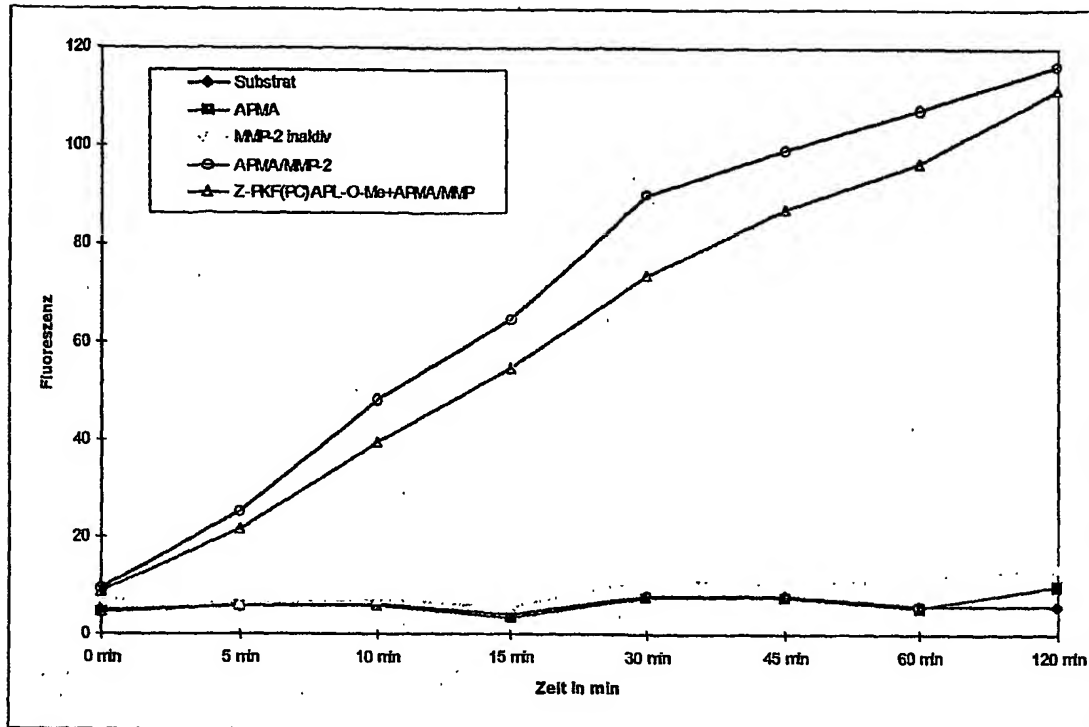


Abbildung 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 02/02583

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K38/08 A61P43/00 A61P39/00 A61P9/00 A61P11/00
 A61P17/02 A61P1/16

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

MEDLINE, EPO-Internal, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DE 198 50 072 A (BAYER AG) 4 May 2000 (2000-05-04) page 3; examples I, IA, IB page 4, line 26 - line 41 ---	1-3
X	YIALLOUROS I ET AL: "Phosphinic peptides, the first potent inhibitors of astacin, behave as extremely slow-binding inhibitors." THE BIOCHEMICAL JOURNAL. ENGLAND 15 APR 1998, vol. 331 (Pt 2), 15 April 1998 (1998-04-15), pages 375-379; XP002219767 ISSN: 0264-6021 cited in the application page 376; example 2.; table 1 -----	1-3

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 November 2002

Date of mailing of the international search report

09/12/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Strack, E

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 02/02583

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)		Publication date
DE 19850072	A	04-05-2000	DE	19850072 A1		04-05-2000
			AU	3148100 A		29-05-2000
			WO	0027377 A2		18-05-2000
			EP	1124845 A2		22-08-2001
			JP	2002529403 T		10-09-2002
<hr/>						

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 02/02583

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 A61K38/08 A61P43/00 A61P39/00 A61P9/00 A61P11/00
 A61P17/02 A61P1/16

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 A61K A61P

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

MEDLINE, EPO-Internal, CHEM ABS Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DE 198 50 072 A (BAYER AG) 4. Mai 2000 (2000-05-04) Seite 3; Beispiele I, IA, IB Seite 4, Zeile 26 - Zeile 41 ---	1-3
X	YIALLOUROS I ET AL: "Phosphinic peptides, the first potent inhibitors of astacin, behave as extremely slow-binding inhibitors." THE BIOCHEMICAL JOURNAL. ENGLAND 15 APR 1998, Bd. 331 (Pt 2), 15. April 1998 (1998-04-15), Seiten 375-379, XP002219767 ISSN: 0264-6021 in der Anmeldung erwähnt Seite 376; Beispiel 2.; Tabelle 1 -----	1-3

☐ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E Älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

& Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche

22. November 2002

Absendedatum des Internationalen Recherchenberichts

09/12/2002

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Beauftragter

Strack, E

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intel
ales Aktenzeichen
PCT/DE 02/02583

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
DE 19850072 A	04-05-2000	DE 19850072 A1	04-05-2000
		AU 3148100 A	29-05-2000
		WO 0027377 A2	18-05-2000
		EP 1124845 A2	22-08-2001
		JP 2002529403 T	10-09-2002
<hr/>			